

PCT/JP 2004/014037

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

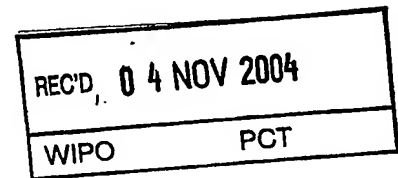
17. 9. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 5 月 2 0 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 1 5 0 2 5 3
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 4 - 1 5 0 2 5 3]



出 願 人 三井化学株式会社
Applicant(s):

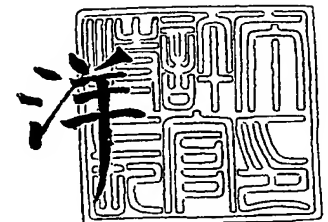
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

2 0 0 4 年 1 0 月 2 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 9 5 5 9 4

【書類名】 特許願
【整理番号】 P0003324
【提出日】 平成16年 5月20日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 1/00
C12P 7/56

【発明者】
【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
【氏名】 森重 敬

【発明者】
【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
【氏名】 和田 光史

【発明者】
【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
【氏名】 徳田 淳子

【発明者】
【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
【氏名】 望月 大資

【発明者】
【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
【氏名】 高橋 均

【特許出願人】
【識別番号】 000005887
【氏名又は名称】 三井化学株式会社
【代表者】 中西 宏幸

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 005278
【納付金額】 16,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

微生物のゲノム上において、D-乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が、解糖系、核酸生合成系又はアミノ酸生合成系に関わる蛋白質の発現を司る遺伝子のプロモーターと機能的に連結することで該D-乳酸デヒドロゲナーゼを発現する微生物。

【請求項 2】

微生物がエシェリヒア・コリである請求項 1 記載の微生物。

【請求項 3】

該微生物が本来有しているピルベートホルメトリアーゼが不活性化あるいは低減されている、且つ／またはFAD依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼが不活化または低減されていることを特徴とする請求項 1 もしくは請求項 2 に記載の微生物。

【請求項 4】

エシェリヒア・コリのゲノム上において、エシェリヒア・コリが本来有するD-乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子のプロモーターに代えてエシェリヒア・コリの解糖系、核酸生合成系又はアミノ酸生合成系に関わる蛋白質の発現を司る遺伝子のプロモーターを該遺伝子と機能的に連結することで該D-乳酸デヒドロゲナーゼを発現するエシェリヒア・コリ。

【請求項 5】

エシェリヒア・コリの解糖系、核酸生合成系又はアミノ酸生合成系に関わる蛋白質の発現を司る遺伝子のプロモーターがエシェリヒア・コリ由来のグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーターである請求項 4 記載のエシェリヒア・コリ。

【請求項 6】

該エシェリヒア・コリが本来有しているピルベートホルメトリアーゼが不活性化あるいは低減されている、且つ／またはFAD依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼが不活化または低減されていることを特徴とする請求項 4 もしくは請求項 5 に記載のエシェリヒア・コリ。

【請求項 7】

請求項 1～3 のいずれか一項に記載の微生物を培地を用いて培養することによりD-乳酸を生産する方法。

【請求項 8】

請求項 4～6 のいずれか一項に記載のエシェリヒア・コリを培地を用いて培養することによりD-乳酸を生産する方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】D-乳酸生産菌

【技術分野】

【0001】

本発明は、効率よくD-乳酸を生産する微生物と、それを用いたD-乳酸の生産方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

生分解性ポリマーであるポリ乳酸は、環境問題の顕在化とともに強い注目を浴びている。現在生産されているポリ乳酸はL-乳酸ポリマーであるが、D-乳酸とのコポリマーとすることにより、物性の向上が期待されることなどから、安価でかつ高純度のD-乳酸供給方法が検討されている。

【0003】

自然界にはD-乳酸を生産する微生物が知られており、そのような微生物としてエシェリヒア・コリを例示することができる。野生型のエシェリヒア・コリのD-乳酸生産性は低いものであるが、近年発展してきた遺伝子組換え技術を適用することでD-乳酸生産性を向上させることが可能であると考えられる。

【0004】

ヤングら [Yang, YT, Metab Eng (1999) 1 141-152] はエシェリヒア・コリ由来のD-乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子について、その発現ベクターをエシェリヒア・コリに導入することで、D-乳酸生産性が向上することを報告している。しかし、D-乳酸デヒドロゲナーゼ活性が10倍程度向上したのに対し、D-乳酸蓄積量は2倍程度上昇したのみであり、また、その蓄積量は8 g/L程度と非常に低いものであった。なお、D-乳酸デヒドロゲナーゼとはピルビン酸からD-乳酸への反応を触媒する酵素である（以下1 d hと呼ぶことがある）。

【0005】

一方で、バンチら [Bunch, PK., Microbiology, 143, 187-195 (1997)] の報告によれば、エシェリヒア・コリ由来1 d h遺伝子の発現ベクターを導入したエシェリヒア・コリは、発現ベクターの導入によりその増殖が阻害されることが報告されている。

【0006】

さらに発現ベクターを用いた遺伝子強化方法では、ベクターの脱落が生じ、目的遺伝子の発現量が低下し、さらには目的物質の生産性が低下するという不具合が生じ得る。

【0007】

こうしたことからD-乳酸工業生産への応用に際し、発現ベクターを用いた1 d h遺伝子の強化方法には幾つかの解決すべき課題が存在し、それに代わる遺伝子強化方法が望まれる。しかしながらそうした取り組みの報告はなされていない。

【0008】

発現ベクターに代わる遺伝子強化方法として、Solemら [Solem, C., Appl Environ Microbiol, 68, 2397-2403 (2002)] が報告したようにゲノム上のある遺伝子のプロモーター領域を任意のプロモーターに置換することで、該遺伝子を強化する方法があげられる。しかし、本技術を上記の1 d h遺伝子を用いたD-乳酸製造に応用した場合を考えると、この方法では強化される1 d h遺伝子はゲノム上の遺伝子1コピーのみであり、多コピーの遺伝子が発現する発現ベクターによる強化方法に比べ、1 d h活性の向上は小さなものであると予測され、D-乳酸生産性が発現ベクターを用いた場合に比べ向上すると予想することは当業者といえども困難であった。

【0009】

【非特許文献1】 Yang, YT, Metab Eng, 1, 141-152 (1999)

【非特許文献2】 Bunch, PK., Microbiology, 143, 187-195 (1997)

【非特許文献3】 Solem, C., Appl Environ Microbiol, 68, 2397-2403 (2002)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

D-乳酸生産において、従来、発現ベクターを用いることでD-乳酸デヒドロゲナーゼが強化されてきた。発現ベクターを用いた方法はD-乳酸工業生産に向けて幾つかの解決すべき課題を有しており、また生産性が低下することが危惧された。

【0011】

本発明の目的は、発現ベクターを用いた強化方法に代わる、安定なD-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の強化方法を提供し、また、D-乳酸をより高生産する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

発明者らは、これら上記の課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、D-乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子をゲノム上において、解糖系、核酸生合成系又はアミノ酸生合成系に関わる蛋白質の発現を司る遺伝子のプロモーターと連結することで発現させた微生物を用いることにより、発現ベクターを用いた遺伝子発現強化方法に比して短時間で著量のD-乳酸を生産させることが可能であることを見いだした。発現ベクターを用いた方法では本発明の方法よりもD-乳酸デヒドロゲナーゼの細胞内発現量は多いが何らかの理由によりこの高い酵素量がD-乳酸の高生産には直接結びついておらず、むしろ、本発明のように細胞内での酵素の発現量はそれほど高くなくとも結果的にD-乳酸の生産性が飛躍的に向上することは極めて驚くべきことである。

本発明は上記知見に基づき完成したものである。

【0013】

すなわち本発明は以下のとおりである。

〔1〕微生物のゲノム上において、D-乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が、解糖系、核酸生合成系又はアミノ酸生合成系に関わる蛋白質の発現を司る遺伝子のプロモーターと機能的に連結することで該D-乳酸デヒドロゲナーゼを発現する微生物。

〔2〕微生物がエシェリヒア・コリである〔1〕記載の微生物。

〔3〕該微生物が本来有しているピルベートホルメトリアーゼが不活性化あるいは低減されている、且つ／またはFAD依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼが不活化または低減されていることを特徴とする〔1〕もしくは〔2〕に記載の微生物。

〔4〕エシェリヒア・コリのゲノム上において、エシェリヒア・コリが本来有するD-乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子のプロモーターに代えてエシェリヒア・コリの解糖系、核酸生合成系又はアミノ酸生合成系に関わる蛋白質の発現を司る遺伝子のプロモーターを該遺伝子と機能的に連結することで該D-乳酸デヒドロゲナーゼを発現するエシェリヒア・コリ。

〔5〕エシェリヒア・コリの解糖系、核酸生合成系又はアミノ酸生合成系に関わる蛋白質の発現を司る遺伝子のプロモーターがエシェリヒア・コリ由来のグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーターである〔4〕記載のエシェリヒア・コリ。

〔6〕該エシェリヒア・コリが本来有しているピルベートホルメトリアーゼが不活性化あるいは低減されている、且つ／またはFAD依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼが不活化または低減されていることを特徴とする〔4〕もしくは〔5〕に記載のエシェリヒア・コリ。

〔7〕〔1〕～〔3〕のいずれか一項に記載の微生物を培地を用いて培養することによりD-乳酸を生産する方法。

〔8〕〔4〕～〔6〕のいずれか一項に記載のエシェリヒア・コリを培地を用いて培養することによりD-乳酸を生産する方法。

【発明の効果】

【0014】

本発明により、高いD-乳酸生産性を有する微生物が提供される。そして、本発明により作成された微生物を培養し、D-乳酸を生産することにより既存の方法に比較してより

経済的にD-乳酸を生産することが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

以下に本発明を詳しく説明する。

本発明における微生物とは本来乳酸を生産する微生物のみならず、何らかの手段を用いることにより乳酸を生産するようになった微生物をも意味する。

【0016】

本発明におけるD-乳酸デヒドロゲナーゼとは、ピルビン酸およびNADHよりD-乳酸およびNADを生成する酵素であり、その由来に特に制限はない。そのようなものとして具体的にはパンチラ [Bunch, PK., Microbiology 143 (1), 187-195 (1997)] が取得したエシェリヒア・コリ由来のD-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子、タグチラ [Taguchi, H., J Biol Chem 5;266(19):12588-94] が取得したラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) 由来のD-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子、その他乳酸菌由来のD-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子にコードされる酵素を例示することができる。

【0017】

本発明における解糖系、核酸生合成系、またはアミノ酸生合成系に関わる蛋白質の発現を司る遺伝子のプロモーターとは、恒常的に微生物内で機能する強力なプロモーターで、かつグルコース存在下でも発現の抑制を受けにくいプロモーターで、具体的にはグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (以下GAPDHと呼ぶことがある) のプロモーターやセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼのプロモーターが例示できる。

【0018】

本発明におけるプロモーターとは σ 因子を有するRNAポリメラーゼが結合し、転写を開始する部位を意味する。例えばエシェリヒア・コリ由来のGAPDHプロモーターはGenBank accession number X02662の塩基配列情報において、397-440に記されている。

【0019】

本発明において、遺伝子が機能的にプロモーターと連結しているとは、当該遺伝子がプロモーターの制御下にあり、遺伝子の発現がプロモーターの制御によりなされるように該遺伝子とプロモーターが結合していることを意味する。

【0020】

本発明におけるD-乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がゲノム上において、解糖系、核酸生合成系、またはアミノ酸生合成系に関わる蛋白質の発現を司る遺伝子のプロモーターと機能的に連結されている微生物としてはエシェリヒア・コリMT-10994 (FERM P-19745) 株を例示することができる。本菌株は茨城県つくば市東一丁目1番1号中央第6にある独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに平成16年3月19日から上記受託番号にて寄託されている。

【0021】

本発明におけるピルベートホルメトリアーゼ (以下pflBと呼ぶことがある) とは、ピルビン酸からギ酸、又はギ酸からピルビン酸に至る代謝経路を触媒する酵素を指す。

【0022】

本発明におけるFAD依存性D-乳酸デヒドロゲナーゼ (以下dldと呼ぶことがある) とは、補酵素FADの存在下において、ピルビン酸からD-乳酸、又はD-乳酸からピルビン酸に至る代謝経路を触媒する酵素を指す。

【0023】

本発明におけるpflBやdldの酵素機能の不活化とは、その酵素活性が完全に消失することを意味する。本発明におけるdldやpflBの酵素機能の低減とは、その酵素活性の一部が消失することを意味する。酵素機能を不活化、あるいは低減するには、そのタンパク質をコードする遺伝子に変異を導入するか、欠失させる、あるいはそのタンパク質を特異的に不活化する薬剤を添加する、紫外線を照射する、などの方法がある。具体的

にはエシェリヒア・コリMT-10994株がpflB遺伝子とddl遺伝子の破壊によりこれらの酵素機能が不活化した細菌として例示できる。

【0024】

本発明におけるグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) とは、グリセルアルデヒド3-リン酸およびNADから1, 3-ビスホスホグリセリン酸、およびNADHを生成する反応を可逆的に触媒する酵素を指す。

【0025】

エシェリヒア・コリMT-10994株はldh遺伝子をゲノム上において、GAPDHプロモーターと機能的に連結することで発現させており、また遺伝子破壊によりpflB、ddlが不活化しているため、これを用いて容易に本発明を実施することが可能である。本菌株は、FERM P-19745の寄託番号で、茨城県つくば市東1丁目1番1号中央第6の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託されている。

【0026】

本発明における培地とは、本発明に関わる微生物またはエシェリヒア・コリがD-乳酸を生産するために必要な栄養源を含むものであれば特に制限されない。このような栄養源としては、炭素源、窒素源、無機イオン、微生物またはエシェリヒア・コリが要求する有機微量元素、核酸及びビタミン類等が挙げられ、これらから適宜選択したものを利用して培地を調製することができる。また、本発明における、微生物またはエシェリヒア・コリを培地を用いて培養するとは、液体培地または固体培地の何れを用いて培養することをも意味するが、通常は液体培地を用いる方が好ましい結果が得られる。

【0027】

培養はフラスコ等を用いて、その中に液体培地を入れて振とう培養してもよいが、通常は液体培地を培養槽に入れて、温度調節及び攪拌をしながら行う。

【0028】

培養条件としては用いる微生物の種類や、用いられる培養装置によって適宜変更可能であるが、例えばMT-10994株を使用する場合は温度を20℃から45℃、より好ましくは33℃から42℃で培養することが好ましい。またpHはNaOHやアンモニア等で6から8、より好ましくは7.1から7.3で調整し培養することが好ましい。培養時間は特に限定されないが、菌体が十分に増殖し、且つD-乳酸が生成するのに必要な時間である。

【0029】

本発明の培養時の通気条件は、通気を全く行わなくともD-乳酸を生産することは可能であるが、より好ましい結果を得るためには通気を行った方がよい。ここでいう通気条件下とは必ずしも培養液中を空気が通過する必要はなく、培養槽の形状によっては適度に培養液を攪拌しながら培養液上の空気層が換気されるような上面通気も含み、培養槽の内部に酸素を含む気体を流入させることを意味する。

【0030】

培地中に蓄積されたD-乳酸を回収する方法としては、例えば培養物を酸性化した後に直接蒸留する方法、乳酸のラクチドを形成させて蒸留する方法、アルコールと触媒を加え乳酸をエステル化した後に蒸留する方法、有機溶媒中に乳酸を抽出する方法、乳酸をイオン交換カラムで分離する方法、電気透析により乳酸を濃縮分離する方法などや、それらを組み合わせた方法が採用できる。

【0031】

以下に実施例により本発明の一例を示すが、これらは本発明をなんら制限するものではない。

【実施例1】

【0032】

エシェリヒア・コリMG1655ddl遺伝子欠失株の作製

エシェリヒア・コリのゲノムDNAの全塩基配列は公知であり (GenBank a

ccession number U00096)、エシェリヒア・コリのd1d遺伝子の塩基配列もすでに報告されている(GenBank accession number X01067)。アメリカンタイプカルチャーコレクションより入手したエシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNAのd1d遺伝子近傍領域の遺伝子情報に基づいて作成された、CAACACCAAGCTTTTCGCG(配列番号1)とTTCCACTCCTTGTGGTGGC(配列番号2)、AACTGCAGAAATTACGGATGCGAGAG(配列番号3)とTGTTCTAGAAAGTTCTTTTGAC(配列番号4)を用いてPCRをおこなった。得られたDNAフラグメントをそれぞれ、制限酵素HindIIIとPstI、PstIとXbaIで消化することにより、それぞれ約1140bpのフラグメントを得た。このDNAフラグメント温度感受性クローニングベクターpTH18cs1(GenBank accession number AB019610)[Hashimoto-Gotoh, T., Gene, 241, 185-191(2000)]をHindIII、XbaIで消化して得られるフラグメントと混合し、リガーゼを用いて結合した後、DH5 α コンピテントセル(タカラバイオ社製)に30℃で形質転換し、クロラムフェニコール10 μ g/mlを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをクロラムフェニコール10 μ g/mlを含むLB液体培地で30℃で一晩培養し、得られた菌体からプラスミドを回収した。このプラスミドをMG1655株に30℃で形質転換し、クロラムフェニコール10 μ g/mlを含むLB寒天プレートに30℃で一晩培養し、形質転換体を得た。得られた形質転換体をクロラムフェニコール10 μ g/mlを含むLB液体培地に接種し、30℃で一晩培養した。次にこれらの培養菌体得られるようにクロラムフェニコール10 μ g/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、42℃で生育するコロニーを得た。得られたコロニーを薬剤を含まないLB液体培地で30℃で一晩培養し、さらに薬剤を含まないLB寒天プレートに塗布して42℃で生育するコロニーを得た。

【0033】

出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップしてそれぞれを薬剤を含まないLB寒天プレートとクロラムフェニコール10 μ g/mlを含むLB寒天プレートに生育させ、薬剤を含まないLB寒天プレートにのみ生育するクロラムフェニコール感受性のクローンを選んだ。さらにこれらの目的クローンの染色体DNAからPCRによりd1d遺伝子を含む約2.0kb断片を増幅させ、d1d遺伝子領域が欠失している株を選抜し、以上を満足するクローンをd1d遺伝子欠失株とし、得られた株をMG1655 d1d遺伝子欠失株と命名した。

【実施例2】

【0034】

エシェリヒア・コリMG1655 d1d&pflB遺伝子欠失株の作製

エシェリヒア・コリのpflB遺伝子の塩基配列はすでに報告されている(GenBank accession number X08035)。MG1655株の染色体DNAのpflB遺伝子近傍領域の遺伝子情報に基づいて作成された、GCACGAAAGCTTTGATTACG(配列番号5)とTTATTGCAATGCTTAGATTTGACTGAAATCG(配列番号6)、TTATTGCAATGCTTATTTACTGCGTACTTCG(配列番号7)とAAGGCCTACGAAAAGCTGCGAG(配列番号8)を用いてPCRを行った。得られたDNAフラグメントをそれぞれ、制限酵素HindIIIとSphI、SphIとPstIで消化することにより、それぞれ約1770bp、約1340bpのフラグメントを得た。このDNAフラグメントを温度感受性クローニングベクターpTH18cs1をHindIII、PstIで消化して得られるフラグメントと混合し、リガーゼを用いて結合した後、DH5 α コンピテントセル(タカラバイオ社製)に30℃で形質転換し、クロラムフェニコール10 μ g/mlを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをクロラムフェニコール10 μ g/mlを含むLB液体培地で30℃で一晩培養し、得られた菌体からプラスミドを回収した。このプラスミドをMG1655 d1d遺伝子欠失株に30℃で形質転換し、クロラムフェニコール10 μ g/mlを含むLB寒天プレートに30℃で一晩培養し、形質転換

体を得た。得られた形質転換体をクロラムフェニコール $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB液体培地に接種し、 30°C で一晩培養した。次にこれらの培養菌体得られるようにクロラムフェニコール $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天プレートに塗布し、 42°C で生育するコロニーを得た。得られたコロニーを薬剤を含まないLB液体培地で 30°C で一晩培養し、さらに薬剤を含まないLB寒天プレートに塗布して 42°C で生育するコロニーを得た。

【0035】

出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップしてそれぞれを薬剤を含まないLB寒天プレートとクロラムフェニコール $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天プレートに生育させ、薬剤を含まないLB寒天プレートにのみ生育するクロラムフェニコール感受性のクローンを選んだ。さらにこれらの目的クローンの染色体DNAからPCRによりpflB遺伝子を含む約2.0kb断片を増幅させ、pflB遺伝子領域が欠失している株を選抜し、以上を満足するクローンをpflB遺伝子欠失株とし、得られた株をMG1655 dld & pflB遺伝子欠失株と命名した。

【実施例3】

【0036】

ldh発現ベクターおよびldh発現ベクター形質転換体の構築

エシェリヒア・コリのldh遺伝子の塩基配列はすでに報告されている (GenBank accession number U36928)。グリセルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) プロモーターを取得するためエシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNAをテンプレートに用いてAACGAATTCTCGCAATGATTGACACGATTC (配列番号9)、及びACAGAATTCTCGCTATTTGT TAGTGAATAAAAGG (配列番号10)によりPCR法で増幅し、得られたDNAフラグメントを制限酵素EcoRIで消化することで約100bpのGAPDHプロモーターをコードするフラグメントを得た。さらにD-乳酸デヒドロゲナーゼ構造遺伝子 (ldh) を取得するためにエシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNAをテンプレートに用いてGGAATTCCGGAGAAAGTCTTATGAAACT (配列番号11)、及びCCCAAGCTTTTAAACCAGTTCGTTTCGGGC (配列番号12)によりPCR法で増幅し、得られたDNAフラグメントを制限酵素EcoRI及びHindIIIで消化することで約1.0kbのD-乳酸デヒドロゲナーゼ構造遺伝子 (ldh) フラグメントを得た。上記の2つのDNAフラグメントとプラスミドpUC18を制限酵素EcoRI及びHindIIIで消化することで得られるフラグメントを混合し、リガーゼを用いて結合した後、エシェリヒア・コリDH5 α コンピテントセル (タカラバイオ社製) に形質転換し、アンピシリン $50\mu\text{g}/\text{mL}$ を含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをアンピシリン $50\mu\text{g}/\text{mL}$ を含むLB液体培地でLB培地で 30°C で一晩培養し、得られた菌体からプラスミドpGAPldhを回収した。このプラスミドpGAPldhをMG1655 dld & pflB遺伝子欠失株に形質転換し、アンピシリン $1\mu\text{g}/\text{mL}$ を含むLB寒天プレートで 37°C で一晩することによりMG1655 dld & pflB遺伝子欠失 / pGAPldh株を得た。

【実施例4】

【0037】

エシェリヒア・コリMG1655 dld & pflB遺伝子欠失株ldhプロモーターのGAPDHプロモーターへの置換

エシェリヒア・コリのゲノムDNAの全塩基配列は公知であり (GenBank accession number U00096)、エシェリヒア・コリのldh遺伝子の塩基配列も報告されている (GenBank accession number U36928)。エシェリヒア・コリMG1655株のldh遺伝子の5'近傍領域の遺伝子情報に基づいて作成された、AAGGTACCACCAGAGCGTTCTCAAGC (配列番号13) とGCTCTAGATTCTCCAGTGATGTTGAATCAC (配列番号14)を用いて、エシェリヒア・コリゲノムDNAを鋳型としてPCRを行うことにより約1000bpのDNA断片を増幅した。

【0038】

また、エシェリヒア・コリMG1655株のグリセルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) プロモーターの配列情報に基づいて作製されたGGTCTAGAGCAATGATTTCACACGATTTCG (配列番号15) とエシェリヒア・コリMG1655株のldh遺伝子の配列情報に基づいて作製されたAACTGCAGGTTCGTTCTCATACACGTCC (配列番号16) を用いて、実施例3で作製した発現ベクターpGAPldhを鋳型としてPCRを行い、GAPDHプロモーターとldh遺伝子の開始コドン近傍領域からなる約850bpのDNAフラグメントを得た。

【0039】

上記により得られたフラグメントをそれぞれ、制限酵素KpnIとXbaI、XbaIとPstIで消化し、このフラグメントを温度感受性プラスミドpTH18cslをKpnIとPstIで消化して得られるフラグメントと混合し、リガーゼを用いて結合した後、DH5 α コンピテントセル (タカラバイオ社製) に30℃で形質転換し、クロラムフェニコール10 μ g/mlを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをクロラムフェニコール10 μ g/mlを含むLB液体培地で30℃で一晩培養し、得られた菌体からプラスミドを回収した。このプラスミドをMG1655dld&pflB遺伝子欠失株に30℃で形質転換し、クロラムフェニコール10 μ g/mlを含むLB寒天プレートに30℃で一晩培養し、形質転換体を得た。得られた形質転換体をクロラムフェニコール10 μ g/mlを含むLB液体培地に接種し、30℃で一晩培養した。次にこれらの培養菌体を得られるようにクロラムフェニコール10 μ g/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、42℃で生育するコロニーを得た。得られたコロニーを薬剤を含まないLB液体培地で30℃で一晩培養し、さらに薬剤を含まないLB寒天プレートに塗布して42℃で生育するコロニーを得た。

【0040】

出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップしてそれぞれを薬剤を含まないLB寒天プレートとクロラムフェニコール10 μ g/mlを含むLB寒天プレートに生育させ、クロラムフェニコール感受性のクローンを選んだ。さらにはこれらの目的クローンの染色体DNAからPCRによりGAPDHプロモーターとldh遺伝子を含む約800bp断片を増幅させ、ldhプロモーター領域がGAPDHプロモーターに置換されている株を選抜し、以上を満足するクローンをMG1655dld&pflB&ldh遺伝子欠失GAPpldhゲノム挿入株と命名した。

【実施例5】

【0041】

MG1655dld&pflB遺伝子欠失株、MG1655dld&pflB遺伝子欠失/pGAPldh株、MG1655dld&pflB&ldh遺伝子欠失GAPpldhゲノム挿入株によるD-乳酸生産

前培養として三角フラスコにいたLB Broth, Miller培養液 (Difco 244620) 25mLにMG1655dld&pflB遺伝子欠失株、MG1655dld&pflB遺伝子欠失/pGAPldh株、MG1655dld&pflB&ldh遺伝子欠失GAPpldhゲノム挿入株を植菌し、一晩、120rpmで攪拌培養を行った。各々の前培養液全量を、グルコース120g/L、コンステイプリカー (日本食品化工製) 5%よりなる培地475gの入った1L容の培養槽 (ABLE社製培養装置BMJ-01) に移し、培養を行った。培養は大気圧下、通気量0.5vvm、攪拌速度200rpm、培養温度35℃、pH7.2 (NaOHで調整) でグルコースが枯渇するまで行った。培養終了後、得られた培養液中のD-乳酸蓄積量をHPLCで定法に従って測定した。結果を図1に示す。それぞれのD-乳酸蓄生産性は、MG1655dld&pflB遺伝子欠失株が48時間で109.0g/L、MG1655dld&pflB&ldh遺伝子欠失/pGAPldh株が48時間で115.6g/L、MG1655dld&pflB&ldh欠失GAPpldhゲノム挿入株が30時間で113.5g/Lであった。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】実施例5における培養液中のD-乳酸蓄積量の経時変化を示したグラフである。図中、三角はMG1655 dld & pflB遺伝子欠失株（実施例2）の結果を、四角はMG1655 dld & pflB遺伝子欠失/pGAPldh株（実施例3）の結果を、丸はMG1655 dld & pflB & ldh欠失GAP pldhゲノム挿入株（実施例4）の結果を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mitsui Chemicals, Inc.

<120> A microorganism capable of producing D-lactic acid

<130> P0003324

<160> 16

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for PCR

<400> 1

caacaccaag ctttcgcg 18

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for PCR

<400> 2

ttccactcct tgtggtggc 19

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for PCR

<400> 3

aactgcagaa attacggatg gcagag 26

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for PCR

<400> 4

tgttctagaa agttctttga c 21

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer for PCR
<400> 5
gcacgaaagc tttgattacg 20

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer for PCR
<400> 6
ttattgcatg cttagatttg actgaaatcg 30

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer for PCR
<400> 7
ttattgcatg cttatttact gcgtacttcg 30

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer for PCR
<400> 8
aaggcctacg aaaagctgca g 21

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer for PCR
<400> 9

aacgaattct cgcaatgatt gacacgattc 30

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for PCR

<400> 10

acagaattcg ctatttgta gtgaataaaa gg 32

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for PCR

<400> 11

ggaattccgg agaaagtctt atgaaact 28

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for PCR

<400> 12

cccaagcttt taaaccagtt cgttcggggc 30

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for PCR

<400> 13

aaggtaccac cagagcgttc tcaagc 26

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for PCR

<400> 14

gctctagatt ctccagtgat gttgaatcac 30

<210> 15

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for PCR

<400> 15

ggtctagagc aatgattcac acgattcg 28

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

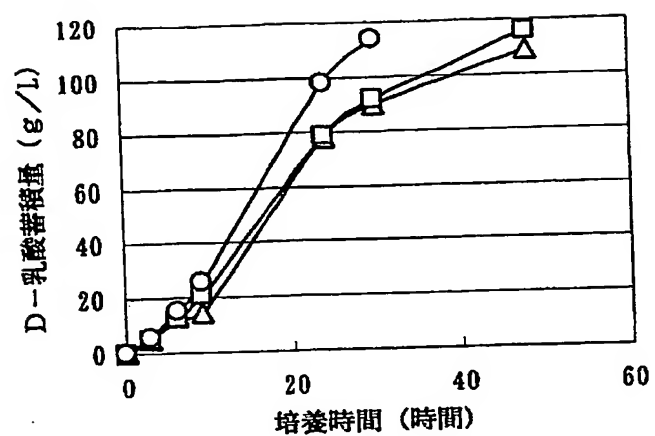
<223> Primer for PCR

<400> 16

aactgcaggt tcgttctcat acacgtcc 28

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 D-乳酸生産において、従来、発現ベクターを用いることでD-乳酸デヒドロゲナーゼが強化されてきた。発現ベクターを用いた方法はD-乳酸工業生産に向けて幾つかの解決すべき課題を有しており、また生産性が低下することが危惧された。

本発明の目的は、発現ベクターを用いた強化方法に代わる、安定なD-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の強化方法を提供し、また、D-乳酸をより高生産する方法を提供することである。

【解決手段】 D-乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子をゲノム上において、解糖系、核酸生合成系またはアミノ酸生合成系に関わるタンパク質の発現を司る遺伝子のプロモーターと連結することで発現させた微生物を培地を用いて培養することにより、D-乳酸を効率よく生産することが可能となる。

【選択図】 なし



特願 2 0 0 4 - 1 5 0 2 5 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 5 8 8 7]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 1 月 4 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都港区東新橋一丁目 5 番 2 号

氏 名

三井化学株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.